

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

In re U.S. Patent Application of )  
 )  
HIRABAYASHI et al. )  
 )  
Application Number: To be Assigned )  
 )  
Filed: Concurrently Herewith )  
 )  
For: ONLINE CHEMICAL REACTION DEVICE AND )  
ANALYSIS SYSTEM )  
 )  
ATTORNEY DOCKET NO. HITA.0486 )

Honorable Assistant Commissioner  
for Patents  
Washington, D.C. 20231

**REQUEST FOR PRIORITY  
UNDER 35 U.S.C. § 119  
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**

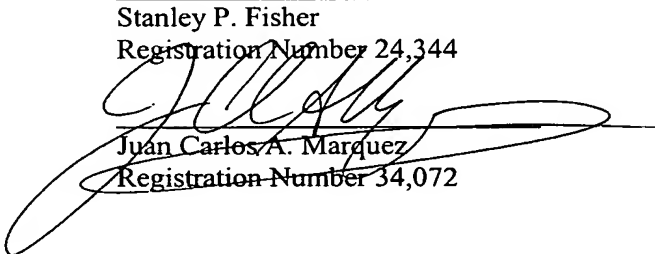
Sir:

In the matter of the above-captioned application for a United States patent, notice is hereby given that the Applicant claims the priority date of March 24, 2003, the filing date of the corresponding Japanese patent application 2003-079346.

A certified copy of Japanese patent application 2003-079346 is being submitted herewith. Acknowledgment of receipt of the certified copy is respectfully requested in due course.

Respectfully submitted,

Stanley P. Fisher  
Registration Number 24,344

  
Juan Carlos A. Marquez  
Registration Number 34,072

**REED SMITH LLP**  
3110 Fairview Park Drive  
Suite 1400  
Falls Church, Virginia 22042  
(703) 641-4200  
January 5, 2004

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日                      2 0 0 3 年    3 月 2 4 日  
Date of Application:

出 願 番 号                      特 願 2 0 0 3 - 0 7 9 3 4 6  
Application Number:

[ST. 10/C]:                      [ J P 2 0 0 3 - 0 7 9 3 4 6 ]

出      願      人                      株式会社日立製作所  
Applicant(s):

2 0 0 3 年    9 月 2 6 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号    出証特 2 0 0 3 - 3 0 7 9 4 0 4

【書類名】 特許願

【整理番号】 H03002561A

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12Q 1/68

【発明者】

【住所又は居所】 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目 2 8 0 番地 株式会社日立製作所中央研究所内

【氏名】 平林 集

【発明者】

【住所又は居所】 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目 2 8 0 番地 株式会社日立製作所中央研究所内

【氏名】 小原 賢信

【発明者】

【住所又は居所】 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目 2 8 0 番地 株式会社日立製作所中央研究所内

【氏名】 岡野 和宣

【特許出願人】

【識別番号】 000005108

【氏名又は名称】 株式会社 日立製作所

【代理人】

【識別番号】 100075096

【弁理士】

【氏名又は名称】 作田 康夫

【電話番号】 03-3212-1111

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 013088

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】

図面 1

【物件名】

要約書 1

【プルーフの要否】

要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 オンライン化学反応装置、及び解析システム

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

表面に生体分子が固定された担体を収める試料流通路を準備する工程と、  
前記試料流通路に、第1の溶液と第1の空気層と試料と第2の空気層と第2の溶液とを導入する工程と、

前記担体に対して前記試料が相対的に移動するように、前記第1の溶液と第1の空気層と前記試料と前記第2の空気層と前記第2の溶液とを移動させ、前記生体分子と前記試料に含まれる物質との反応を行わせる工程とを有することを特徴とする化学反応方法。

【請求項 2】

前記生体分子は酵素であり、前記反応は、前記酵素による前記試料物質の消化反応であることを特徴とする請求項1に記載の化学反応方法。

【請求項 3】

前記試料流通路の一方の端部を第1のパイプと、前記他方の端部を第2のパイプとに各々接続させる工程をさらに有し、

前記反応を行わせる工程では、前記第1の空気層と前記第2の空気層とを、前記第1のパイプと前記第2のパイプとに各々位置するようにすることを特徴とする請求項1に記載の化学反応方法。

【請求項 4】

前記導入する工程では、導入される前記試料の体積は、 $0.1\mu\text{L}$ 以上 $100\mu\text{L}$ 以下であることを特徴とする請求項 1 に記載の化学反応方法。

【請求項 5】

前記導入する工程では、導入される前記試料の体積は、前記試料流通路の内部体積から前記担体の体積を除いた体積以上の体積であることを特徴とする請求項 2 に記載の化学反応方法。

【請求項 6】

前記反応を行わせる工程では、前記試料流通路の内部で、前記試料は乱流、ま

たは遷移流れ領域を形成するものであることを特徴とする請求項 1 に記載の化学反応方法。

【請求項 7】

前記反応を行わせる工程では、前記試料を移動させるべく調整される水圧  $\Delta P$  と、前記試料の流量  $Q$  とが  $\Delta P \propto Q^{1.5 \pm 0.4}$  を満たす関係にあり、前記試料流通路の内部で前記試料が乱流、または、遷移領域流れを形成することを特徴とする請求項 1 に記載の化学反応方法。

【請求項 8】

前記担体は複数の微粒子であり、前記試料流通路はキャピラリーであることを特徴とする請求項 1 に記載の化学反応方法。

【請求項 9】

前記担体は反応容器に設けられる構造物であり、前記試料流通路は前記反応容器に設けられる流路であることを特徴とする請求項 1 に記載の化学反応方法。

【請求項 10】

複数の微粒子と試料とを収めるキャピラリーと、  
前記キャピラリーの内部を移動する液体の流量を制御する第 1 のポンプと第 2 のポンプと、  
前記キャピラリーの一方の端部に連結し、かつ前記第 1 のポンプと連結する第 1 のパイプと、  
前記キャピラリーの他方の端部に連結し、かつ前記第 2 のポンプと連結する第 2 のパイプと、  
前記第 1 のパイプと前記第 2 のパイプとの少なくともいずれかに連結する空気挿入管と溶液挿入管と試料挿入管を有し、  
前記溶液挿入管は、溶液を挿入するものであり、  
前記試料挿入管は、前記試料を挿入するものであり、  
前記空気挿入管は、挿入される前記溶液と前記試料との間に、空気を挿入するものであることを特徴とする化学反応装置。

【請求項 11】

前記試料の前記移動は、往復移動であることを特徴とする請求項 10 に記載の

化学反応装置。

【請求項 12】 前記キャピラリーの温度を調整する温度調整器をさらに有することを特徴とする請求項 10 に記載の化学反応装置。

【請求項 13】 キャピラリー長可変

前記キャピラリーは、長さが変わることを特徴とする請求項 10 に記載の化学反応装置。

【請求項 14】

前記空気挿入管と前記溶液挿入管と前記試料挿入管とを、前記第 1 のパイプと前記第 2 のパイプとの少なくともいずれかに、選択的に連結させるための連結バルブをさらに有することを特徴とする請求項 10 に記載の化学反応装置。

【請求項 15】

前記空気挿入管と前記溶液挿入管と前記試料挿入管との少なくともいずれかを前記第 1 のパイプに選択的につなげるための第 1 の連結バルブと、前記空気挿入管と前記溶液挿入管と前記試料挿入管との少なくともいずれかを前記第 2 のパイプに選択的につなげるための第 2 の連結バルブとをさらに有することを特徴とする請求項 10 に記載の化学反応装置。

【請求項 16】

複数の微粒子と試料とを収めるキャピラリーと、

前記キャピラリーの内部を移動する液体の流量を制御する第 1 のポンプと第 2 のポンプと、

前記キャピラリーの一方の端部に連結し、かつ前記第 1 のポンプと連結する第 1 のパイプと、

前記キャピラリーの他方の端部に連結し、かつ前記第 2 のポンプと連結する第 2 のパイプと、

前記第 1 のパイプと前記第 2 のパイプとの少なくともいずれかに連結する空気挿入管と溶液挿入管と試料挿入管を

前記キャピラリーの温度を調整する温度調整器とを具備する化学反応装置とを有し、

前記化学反応装置から、前記試料を輸送する輸送パイプと、

前記輸送パイプとつながる液体クロマトグラフ質量分析装置と、  
前記液体クロマトグラフ質量分析装置の出力を得る手段とを有し、  
前記溶液挿入管は、溶液を挿入するものであり、  
前記試料挿入管は、前記試料を挿入するものであり、  
前記空気挿入管は、挿入される前記溶液と前記試料との間に、空気を挿入するものであることを特徴とする解析システム。

【請求項 17】

前記第1のポンプと前記第2のポンプとは、前記試料を移動させるべく調整される水圧を $\Delta P$ 、前記試料の流量を $Q$ として、 $\Delta P$ を $\Delta P \propto Q^{1.5 \pm 0.4}$ の関係を満たす範囲に定めるものであることを特徴とする請求項 16 に記載の解析システム。

【請求項 18】

タンパク質のデータベースと、  
前記液体クロマトグラフ質量分析装置からの出力に対応するタンパク質のデータを前記データベースから検索する情報処理装置とをさらに有し、  
前記試料に含まれるタンパク質の同定を行うことを特徴とする請求項 16 に記載の解析システム。

【請求項 19】

複数の前記化学反応装置を有し、各々の前記化学反応装置は、具備する前記微粒子に各々酵素が固定されるものであることを特徴とする請求項 16 に記載の解析システム。

【請求項 20】

複数の前記化学反応装置を有し、各々の前記化学反応装置は並列で動作することを特徴とする請求項 16 に記載の解析システム。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は微量生体試料の化学反応に関わり、特にタンパク質やペプチド、糖鎖、遺伝子の反応に関する。また、本発明は微量生体試料の化学反応に関わる解析



システムに関する。

### 【0002】

#### 【従来の技術】

酵素反応における酵素の活性向上やオンライン化によるサンプル損失低減を目指した技術が幾つか開発されている。例えば特許文献1には、酵素を固定化したキットサンビーズ（直径0.5～3mm）を用いた酵素反応方法に関する記述がある（【特許文献1】）。この技術では、酵素固定化ビーズをサンプル液に添加し、振とうなどの方法を用いて、サンプル液に固定化酵素を分散させながら反応を促進させる。酵素を固定化する結果、酵素活性を実質的に高めることができるが、反応時間は1～50時間程度必要とされる。また、例えば特許文献2には、サンプル損失低減を目指したオンライン酵素反応技術に関する記述がある（【特許文献2】）。この技術では、カラムに酵素固定化担体ゲルを充填し、サンプル溶液をポンプでカラム送液する。この方法を用いるとシステムの自動化が可能だが、反応時間は数時間程度必要と見積られる。また、酵素反応とは異なるが、キャピラリーの中に、プローブなどの化学物質を表面に結合させたビーズなどの粒子を並べるプローブアレー（ビーズアレイ）に関する記述が例えば特許文献3にある（【特許文献3】）。この例では、サンプル液をプローブアレーに導入することにより、サンプル物質が化学物質と特異的に結合し、そのことを光学検出することができる。粒子毎に結合させる化学物質を変えることができるが、反応効率最適化に関する情報は明らかにされていない。

### 【0003】

オンライン酵素反応の促進には、固定化酵素の表面積を増加させることも有効である。例えば非特許文献1には、シリコン基板に32本の微細流路（幅50 $\mu$ m、深さ250 $\mu$ m、長さ11mm）を形成させ、流路表面に酵素を固定化させる技術が記載されている（【非特許文献1】）。酵素を固定化する表面積を大きくすることができるため、酵素反応時間は短時間で完了させることができる。ただ、微細流路に一定流量でサンプルを導入するため、サンプルを導入する水圧が非常に高くなり、反応効率に影響を及ぼす。さらに、キャピラリーに多孔質のモノリスカラムを形成し、モノリス表面に酵素を固定化する酵素固定化モノリスカラムに関

する記述が、例えば非特許文献2に記載されている（【非特許文献2】）。酵素を固定化する表面積を非常に大きくすることができるため、酵素反応時間は短時間となり、スループットは向上する。そのうえ、モノリスカラムは多孔質なので、比較的低い水圧でサンプルを導入することができる。しかし、モノリスカラムの製作は煩雑であり、かつ製作コストが高くなる。

#### 【0004】

【特許文献1】特開平9-313196号公報

【特許文献2】特開平11-196897号公報

【特許文献3】特開平11-243997号公報

【非特許文献1】Analytical Chemistry Vol. 72 (2000) p.286-293（アナリティカル ケミストリー誌、第72巻、2000年、第286項から第293項）

【非特許文献2】Analytical Chemistry Vol. 74 (2002) p.4081-4088（アナリティカル ケミストリー誌、第74巻、2002年、第4081項から第4088項）

#### 【0005】

##### 【発明が解決しようとする課題】

酵素反応は従来バッチで容器を用いた溶液反応を行うことが多かったが、バッチ処理ではサンプルの損失が無視できない。また、酵素活性の低下も課題であった。従って、微量生体サンプルの化学反応処理においては、微量であるためにバッチ処理は不利となりがちである。

#### 【0006】

一方、サンプル損失低減を目指した従来の技術においては、上記の通り反応時間は数時間程度から数十時間程度必要とされ、反応には長時間費やさざるを得ない。また、ビーズを用いた反応方法についても、反応効率最適化に関する情報は明らかにされていなかった。

#### 【0007】

これらの課題を解決するためには、微量生体サンプルを低損失で化学反応処理する化学反応方法及び化学反応装置が必要である。

#### 【0008】

さらに、サンプル損失低減を目指し、かつ短時間で処理するためには、化学反

応する分子同士の衝突回数を増加させる化学反応方法及び化学反応装置が必要である。

#### 【0009】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明における化学反応方法では、表面に生体分子が固定された担体を収める試料流通路を準備し、試料流通路に第1の溶液と第1の空気層と試料と第2の空気層と第2の溶液とを導入する。そして、担体に対して試料が相対的に移動するように、第1の溶液と第1の空気層と試料と第2の空気層と第2の溶液とを移動させ、生体分子と試料に含まれる物質との反応を行わせる。

#### 【0010】

上記生体分子は酵素でもよく、その際には上記反応は酵素による試料物質の消化反応である。

#### 【0011】

第1の空気層と第2の空気層とについては、試料流通路の一方の端部を第1のパイプと、他方の端部を第2のパイプとに各々接続させ、第1の空気層と第2の空気層とが、第1のパイプと第2のパイプとに各々位置するようにしてもよい。

#### 【0012】

試料流通路に導入される試料の体積は、 $0.1\mu\text{L}$ 以上 $100\mu\text{L}$ 以下であってもよく、また試料流通路の内部体積から微粒子の体積を除いた体積以上の体積であってもよい。

#### 【0013】

第1、2の気体層は、第1の溶液と試料との間、第2の溶液と試料との間に各々挟まれることにより、第1、2の溶液と試料とが混ざること防止する。

#### 【0014】

上記化学反応方法では、担体と試料流通路は、ビーズとキャピラリーであっても良く、また反応容器に設けられた構造物と同じく反応容器に設けられた流路であっても良い。

#### 【0015】

また、本発明における化学反応装置及びこれを用いる解析システムは、微粒子

を収めたキャピラリーを有し、かつキャピラリーの内部を移動する液体の流量を制御する第1のポンプと第2のポンプを具備する。さらに、キャピラリーの一方の端部に連結し、かつ第1のポンプと連結する第1のパイプと、キャピラリーの他方の端部に連結し、かつ第2のポンプと連結する第2のパイプと、第1のパイプ、または第2のパイプの少なくともいずれかにつながる空気挿入管と溶液挿入管と試料挿入管とを有する。そして、空気挿入管は、挿入される溶液と試料との間に、空気を挿入する

上記の試料の移動は、往復移動であってもよい。

#### 【0016】

また、空気挿入管と溶液挿入管と試料挿入管とを第1のパイプ、または第2のパイプの少なくともいずれかに選択的に連結させるための連結バルブをさらに有してもよい。

#### 【0017】

また、空気挿入管と溶液挿入管と試料挿入管との少なくともいずれかを第1のパイプに選択的につなげるための第1の連結バルブと、空気挿入管と溶液挿入管と試料挿入管との少なくともいずれかを前記第2のパイプに選択的につなげるための第2の連結バルブとをさらに有してもよい。

#### 【0018】

上記化学反応装置は単独で用いられても良く、複数をつなげて一連の化学反応を行うべく用いられても良く、さらに複数を並列で動作させても良い。またオンライン化された化学反応システム、質量分析システムなどに組み込まれて用いられても良い。

#### 【0019】

##### 【発明の実施の形態】

図1に、本発明に基づく化学反応装置の一実施例の構成図を示す。管状に形成された反応部1には、化学物質が固定化されている。そして、バッファー液がバルブ2や反応部1などに充填される。先ず、エア導入口3より所定の体積のエアがバルブ2に第二のポンプ4により吸引される。次に、サンプル液はサンプル導入口5からバルブ2に第二のポンプ4により吸引される。さらに、エア導入口3

より所定の体積のエアがバルブ 2 に第二のポンプ 4 により吸引される。その後、第一のポンプ 6、及び、第二のポンプ 4 により、エア、サンプル液、エアが順次反応部 1 に輸送される。その結果、反応部 1 はサンプル液で満たされ、サンプル液の両端はバッファー液との混合を防止するためのエアで挟まれる形態をとる。反応部 1 は恒温部 7 で例えば 37℃程度に温度制御される。サンプル液は、第一のポンプ 6、及び、第二のポンプ 4 により反応部 1 を所定の流速で一定体積だけ往復運動する。所定の時間だけ往復運動を繰り返すことにより、反応部 1 において化学反応が完了する。化学反応を起こしたサンプル（反応産物）は、バルブ 2 を通って、排出口 8 より排出される。その後、クリーニングのために、バッファー導入口 9 より導入されるバッファー液により反応部 1 やバルブ 2 は洗浄される。また、サンプルが導入されない保管時には、反応部 2 の温度は 4℃程度に変更され、固定化化学物質の変化を防止する。

#### 【0020】

本発明の一実施例に基づく化学反応装置における反応部 1 の構造を、図 2 (a) に示す。長さ 200 mm のキャピラリー 10 (内径 150  $\mu$ m、外径 360  $\mu$ m) には、トリプシン酵素を固定化したガラスビーズ 11 (直径 103  $\mu$ m) が約 2800 個だけ導入される。キャピラリー 10 の両端部には、ガラスビーズ 11 を固定するために、別の石英キャピラリー 12 (内径 50  $\mu$ m、外径 150  $\mu$ m、長さ 5 mm) が挿入されている。キャピラリー 10、12 の内面には、サンプルの吸着を防止するためのコーティングを施すことが有効だが、ガラスビーズ 11 と同様の化学物質を固定化しても構わない。このような構造の反応部では、反応部体積が約 2  $\mu$ L となる。

#### 【0021】

一例として、トリプシン固定化ガラスビーズの作製方法について述べる。表面がアミノ基で修飾されたガラスビーズ 11 へのトリプシン固定化は、以下の手順で行うことができる。

1. <ビーズ表面アミノ基をカルボキシル基に置換>ポリプロピレン製チューブ (2 mL 容器) にアミノ基修飾ガラスビーズ (100 mg) を入れ、そこに濃度 480 mM の無水コハク酸溶液 (溶媒: 1-メチル-2-ピロリドン) を 500  $\mu$ L だけ添

加する。

2. 上記チューブごと、無水コハク酸溶液とビーズを50℃で60分間攪拌する。
3. 濃度0.1Mのホウ酸バッファー (pH8.0) を500 $\mu$ Lだけ上記チューブに加え、20℃で10分間放置する。
4. 1mLの純水でチューブ内のビーズを洗浄する。この洗浄プロセスは6回繰り返す。
5. <カルボキシル基の活性化>20mMのN-ヒドロキシスクシンイミドと0.1MのN-エチル-N'-3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミドの混合溶液 (1mL、溶媒: 濃度0.1Mのホウ酸バッファー (pH6.2)) でビーズを1回洗浄する。
6. ビーズに20mMのNヒドロキシスクシンイミドと0.1MのN-エチル-N'-3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミドの混合溶液 (1mL、溶媒: 濃度0.1Mのホウ酸バッファー (pH6.2)) を添加する。チューブごとビーズを氷上で30分間放置 (時々攪拌) し、ビーズのみ回収する。
7. ビーズを200 $\mu$ Lの濃度0.1Mホウ酸バッファー (pH6.2) で洗浄する。
8. <トリプシン固定化>40mgトリプシンを800 $\mu$ Lの濃度0.1Mホウ酸バッファー (pH6.2) に溶解させ、ビーズに添加する。4℃で一昼夜 (16時間) 放置する。
9. ビーズを2mLの濃度10mM Tris-HCl溶液 (pH8.0) で洗浄する。この洗浄プロセスを6回繰り返す。
10. ビーズを濃度10mM のTris-HCl溶液 (pH8.0) に浸し、4℃で保存する。

#### 【0022】

これまで述べた化学物質固定化法は、必ずしもトリプシンのみの固定化に適用が限定される訳ではない。得られた酵素固定化ガラスビーズ11をバッファー液とともにキャピラリー10にポンプなどを使用して吸引することにより、図2(a)に示すようにキャピラリー10に充填することができる。ビーズの充填具合を観測するために、キャピラリー10の材質はある程度透明であることが望ましい。この酵素固定化ガラスビーズ11は、乾燥すると酵素活性が低下する傾向がある。そこで、一旦製作された反応部1にはバッファー液を充填し、蓋をするなどして乾燥を防止し、4℃で保存することが望ましい。以上のような取り扱いによ

り、反応部 1 を繰返し使用しても、反応部 1 の酵素活性は保持される。

### 【0023】

本発明の一実施例に基づく化学反応装置における送液プロトコルを図 3 に模式的に示す。図中、右方に第二のポンプ 4 が、左方に第一のポンプ 6 がキャピラリー 13、14 にそれぞれ接続されている。反応部 1 の体積が  $2\ \mu\text{L}$  であり、サンプル体積が  $5\ \mu\text{L}$  とする。そして、反応部 1 やキャピラリー 13、別のキャピラリー 14 には、予め濃度  $10\text{mM}$  の Tris-HCl 溶液 ( $\text{pH}8.0$ ) などの液体が満たされているが、最初は、反応部 1 とキャピラリー 13 は接続されていない。(a) 第二のポンプ 4 によりキャピラリー 13 の開放端に  $1\ \mu\text{L}$  のエアが吸引される、(b) 続いて、 $5\ \mu\text{L}$  のサンプルが、さらに、 $1\ \mu\text{L}$  のエアがポンプ 4 によりキャピラリー 13 に吸引される。(c) サンプル液は両端をエアで挟まれたまま、キャピラリー 13 の開放端は反応部 1 に接続される。(d) サンプル液は第二のポンプ 4 と第一のポンプ 6 により反応部 1 に移動するが、左側のエアがキャピラリー 14 に導入された状態で停止する。この時、キャピラリー 13 に残存するサンプルの体積は  $3\ \mu\text{L}$  である。(e) 第二のポンプ 4 と第一のポンプ 6 によりサンプルが左の方に向かって流量  $5\ \mu\text{L}/\text{分}$  で移動するが、サンプルは反応部 1 にあるが右側のエアはキャピラリー 13 に留まる位置まで移動するとポンプ 4 と 6 は停止する。キャピラリー 13 に残存するサンプル ( $3\ \mu\text{L}$ ) が反応部 1 に導入されるまでに要する時間は  $0.6$  分である。(f) 第二のポンプ 4 と第一のポンプ 6 によりサンプルが右の方に向かって流量  $5\ \mu\text{L}/\text{分}$  で移動するが、サンプルは反応部 1 にあるが左側のエアはキャピラリー 14 に留まる位置まで移動すると移動は停止する。キャピラリー 14 にあったサンプル ( $3\ \mu\text{L}$ ) が反応部 1 に導入されるまでに要する時間は  $0.6$  分である。所定の時間 (回数) だけ (e) と (f) を繰返すことにより、化学反応は促進される。(g) サンプル液 (反応産物) は両端をエアで挟まれたまま、キャピラリー 13 に移動し、(c) と同様の状態になる。(h) 反応部 1 とキャピラリー 13 との結合を外し、サンプル液 (反応産物) を取り出す。(i) キャピラリー 13 はバッファー液で満たされ、最初の状態に戻る。サンプル液は両端をエアで挟まれたままキャピラリーに移動することにより、Tris-HCl 溶液などの液体と混ざることが防止されている。なお、(e) と (f) の反復

過程において、サンプル液は反応部 1 の中を往復運動するが、エアは反応部 1 に導入されないことが望ましい。エアが反応部に複数回導入されると、サンプル液とバッファーとの混合を防止するためのエアが小さい気泡に分割され、サンプル液がバッファーで希釈されることがあるためである。また、サンプル体積は反応部 1 の体積より大きくなければ、サンプル液の反復反応において、サンプル液とバッファー液との混合が生じる可能性が高くなる。

#### 【0024】

図 4 に、本発明の一実施例に基づく送液プロトコルに従った化学反応装置の動作シーケンスを示す。化学反応装置は反応部 1、バルブ 2、エア導入口 3、サンプル導入口 5、バッファー導入口 9、恒温部 7、第一のポンプ 6、第二のポンプ 4、及び、排出口 8 から構成される。反応動作の開始前には、反応部 1 はバッファー液で満たされ、第一のポンプ 6 や第二のポンプ 4 に繋がる配管もバッファー液などの液体で満たされる。また、ペルチェ素子などからなる恒温部 7 により反応部 1 は予め定められた温度に制御される。(a) バルブ 2 が第二のポンプ 4 とエア導入口 3 とを接続し、第二のポンプ 4 により所定の体積のエアがバルブ 4 より第二のポンプに結合された配管に向けて導入される。(b) 次に、バルブ 2 が回転し、サンプル導入口 5 と第二のポンプ 4 とを接続し、第二のポンプ 4 により所定の体積のサンプルがバルブ 2 より第二のポンプ 4 に結合された配管に向けて導入される。(c) 再度バルブ 2 が回転し、第二のポンプ 4 とエア導入口 3 とを接続し、第二のポンプ 4 により所定の体積のエアがバルブ 2 より第二のポンプ 4 に結合された配管に向けて導入される。図 3 (c) の状態に対応する。(d) バルブ 2 が回転し、バルブ 2 より第二のポンプ 4 に結合された配管に向けて導入されたエア/サンプル/エアは反応部 1 の入口に接続される。第一のポンプ 6 と第二のポンプ 4 により、サンプルは反応部 1 を満たすまで第一のポンプ 6 方向に移動する。(e) 所定の時間だけ、サンプルは反応部 1 の中を往復運動する。トリプシンを用いたタンパク質の酵素消化反応の場合には 10 分ほどで、タンパク質はペプチド化する。この時間設定は反応部に固定された化学物質の種類やサンプルの種類に応じて、設定することができる。(f) バルブ 1 4 によりバルブ 2 と排出口 8 とが接続される。第一のポンプ 6 により、サンプルは反応部 1 から排出され



排出口 8 方向に移動し外部に排出される。(g) バルブ 14 が動作し、第二のポンプ 4 に向けた配管とバルブ 2 とを接続する。次に、バルブ 2 が回転し、バッファ導入口 9 と第二のポンプ 4 に向けた配管を接続する。そして、バッファ導入口 9 より新しいバッファ液を導入する。(h) バルブ 2 が回転し、第二のポンプ 4 に結合された配管は反応部 1 に接続され、新しいバッファ液が反応部 1 に導入される。新しいバッファ液は反応部 1 を往復運動するなどして反応部 1 などを洗浄する。その後、バルブ 15 が動作し、排出口 16 と反応部 1 とが接続され、第二のポンプ 4 により排出口 16 よりバッファ液が排出される。引き続き反応過程を行う場合には、上記<エア吸引>のプロセルに戻る。一方、反応過程を終了する場合には、恒温部 7 により反応部 1 の温度は 4℃に低下され、反応部 1 の機能低下を防止する。反応部 1 は繰返し使用できるが、機能が低下した場合には交換が必要である。図 2 (b) に示すように、セルのキャピラリー 10 をアルミなどの熱伝導性の高い材質の容器 28 に固定し、キャピラリー 10 の両端にフィッティング 29 を装着できるようにしておく、反応部 1 の交換が容易となる。図 4 の例ではエア導入口 3 がバルブ 2 に接続されていたが、それ以外に、図 5 (a) に示すようにバルブ 15 に接続させても構わない。このような構成では反応部 1 にエアが導入されないため、サンプル液とバッファとの混合は防止され易い。さらに、排出口 8 をバルブ 15 に接続させても問題はない。その際には反応産物はバルブ 15 に接続された排出口 8 より取り出すこともできる。また、例えば、反応部の反応効率が十分に高い場合には、サンプルを反応部 1 に一回通過させるだけで反応が完了する。そのためこの場合には、図 3 の (e) や (f) のようなサンプルの往復運動は必ずしも必要ではない。また、図 5 (b) に示すように、バルブ 35 は使用せず、ポンプ 4 や排出口をバルブ 2 にそれぞれ直結しても構わない。この場合、サンプル液の排出時には、一旦ポンプ 4 の方にサンプル液を移動させ、次に、バルブ 2 を介して排出口 8 へサンプル液を移動する。バルブ 35 がないので、装置の構造がより単純化され、低コスト化が可能である。

#### 【0025】

反応部 1 におけるサンプルの送液条件は、化学反応の効率に強く関係する。例

えば、流量（流速）が十分に低い場合には、液体の流れは層流となる。この場合、サンプル分子の流れに対する垂直な運動成分が熱拡散により生じ、この熱拡散が化学物質の固定された壁面との衝突を支配する。衝突過程のなかで、一定の確率で化学反応は進められる。サンプル分子がタンパク質の場合には、拡散速度は  $10 \mu\text{m}/\text{秒}$  程度であり、壁面近傍のサンプル分子のみが化学反応を起こすが、流れの中心部にある大半のサンプル分子は壁面近傍に移動するには十分な時間が必要である。即ち、サンプル分子全体の化学反応は十分な時間を掛けないと困難である。一方、流量（流速）が十分に高い場合には、液体の流れは乱流となる。この場合、乱流拡散が反応効率の向上に本質的な役割を果たすため、全てのサンプル分子が壁面に衝突し易くなり、全体の化学反応効率は向上する。完全な乱流でなくても、部分的な乱流が生じる遷移流であれば、層流の場合に比較して化学反応効率は増加するため、有効である。

#### 【0026】

一般に、円管に対する抵抗係数  $C$  がレイノルズ数  $Re$  の  $-1$  乗に比例する場合には、層流が形成されることが知られる。一方、乱流の場合には、抵抗係数  $C$  はレイノルズ数  $Re$  の  $0$  乗に比例し、部分的に乱流が発生する遷移域の流れに対してはレイノルズ数  $Re$  の約  $-1/2$  乗に比例するといった中間的な依存性を示すとされる。乱流拡散が有効なのは遷移流、及び、乱流であるため、抵抗係数  $C$  はレイノルズ数  $Re$  の  $0$  乗から  $-1$  乗の範囲のべき乗に比例する場合に相当する。抵抗係数  $C$  は流量  $Q$  の  $-2$  乗に比例し、背圧  $\Delta P$  の  $1$  乗に比例する。また、レイノルズ数  $Re$  は流量  $Q$  に比例する。以上より、乱流拡散が有効であるのは、以下の条件との結論が得られる。

#### 【0027】

【数1】

$$\Delta P \propto Q^{1 \sim 2} \quad \text{(数1)}$$

#### 【0028】

上式において、 $\Delta P$  が  $Q$  に比例する場合は層流に相当し、 $Q$  の  $2$  乗に比例する場合は完全な乱流に相当する。実際には、完全な乱流を実現することは物理的に

困難な場合が多く、層流でなければ乱流拡散は有効である。即ち、 $\Delta P$ は $Q$ の（1.5 ± 0.4）乗に比例する条件であれば、十分な効果が得られる。

#### 【0029】

実際には、上記条件を満たすように、予め送液条件（流量）を設定しておくことが現実的である。例えば、液体クロマトグラフ用ポンプを使用すると、反応部1に対する液体流量 $Q$ と背圧 $\Delta P$ の関係を調べることができる。これより、上式のような非線型関係を満たす適当な流量を決定すれば、乱流拡散を用いた化学反応を実現させることができる。図6に、酵素消化反応結果を示す。用いたサンプルはチトクロムCタンパク質であり、反応部1にはトリプシン酵素を固定化した。また、流量が5  $\mu$ L/分の場合、背圧 $\Delta P$ は $Q$ の約1.6乗に比例し、上記条件が満たされることを確認した。図中、縦軸は残存するタンパク質の量（相対値）であり、横軸は反応時間である。層流の場合には、反応は流量には依存せず反応時間に依存するはずである。図6において流量が5  $\mu$ L/分の場合と2.5  $\mu$ L/分の場合を比較すると、流量が半分になると、反応時間は同一であるにも関わらず、反応効率は低下することが示される。このことは、乱流や遷移流の特徴である。より高い液体流量で反応を行えば、反応効率はさらに向上すると期待されるが、背圧 $\Delta P$ も顕著に増大する。そのため、配管やキャピラリーの接続部では液体リークが発生しないように注意する必要がある。

#### 【0030】

図6に示す結果では、反応時間が15分程度では半分近くのタンパク質が残留する。これは、反応に関与しないデッドボリュームが反応部1の体積の30%近くを占めていたためと、ポンプを1台しか使用していなかったためである。実際の送液では、ポンプのプッシュ時には所定の流量を実現できるが、プル時には所定の流量を達成できなかった。図2(a)に示すような反応部の構造によりデッドボリュームは二桁低減する。さらに、2台のポンプを使用することにより送液が確実となり、流量が5  $\mu$ L/分では反応時間が15分でタンパク質はほぼ完全に消化されることが確認された。反応部1のデッドボリューム、及び、送液制御には注意が必要であるが、基本的には先述の条件を満たしておれば、十分な効果を得ることができる。

## 【 0 0 3 1 】

図 2 (a)に示すような反応部の構造のセルで、2 台のポンプを使用して得られたタンパク質の消化例を図 7 に示す。この図は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で得られた分離バンドの画像例である。最も左端の電気泳動レーンには未消化タンパク質を泳動し、その右のレーンには 1 5 分だけ酵素消化反応を施したサンプルを泳動したものである。左端のレーンでは矢印で示すタンパク質のバンドが明確に観測されるのに対し、右となりのレーンの点線で囲った領域には分離バンドが検出されない。さらに右のレーンには、3 0 分反応させたサンプルを泳動したが、同様に分離バンドが検出されない。このことは、未消化の残留タンパク質が殆どなくなったことを示す。また、酵素消化により生成される様々な質量のペプチド断片は、各断片の量が微量となり、分離バンドの画像では観測が困難と説明される。

## 【 0 0 3 2 】

また、図 2 (a)ではガラスビーズに酵素を固定化し、ガラスビーズをキャピラリー内にはほぼ一列に並べる例を示したが、酵素を固定化した硬質微粒子（あるいは構造物）を流路に配置して先述の条件で動作させれば問題はない。例えば、図 8 に示すように、シリコン基板 3 0 に流路 3 1、及び、乱流を生じさせるための構造物 3 2 を配置したセルであっても、問題はない。ガラス基板 3 3 に穴 3 4 をあけ、シリコン基板 3 0 に接合することにより、セルを形成することができる。乱流を生じさせるための微粒子（あるいは構造物）はガラスのように硬質であることが望ましいが、ゲルのような軟質でなければ問題がなく、材質が P D M S （ポリジメチルシロキサン）などの樹脂でも構わない。

## 【 0 0 3 3 】

図 9 に、液体クロマトグラフ/質量分析装置（L C / M S ）を用いたタンパク質の解析プロトコル、及び、本発明の一実施例に基づく化学反応装置を組み込んだ解析システム（ショットガン解析システム）の構成図との関係を示す。図中、点線で囲った部分が本発明の一実施例に基づく化学反応装置を組み込んだ解析システムである。生体から得られる生体サンプルは、液体クロマトグラフやアフィニティーカラムなどにより分離・精製される。分離・精製により得られるサンプル

(タンパク質混合液)は、化学反応装置において、固定化されたトリプシンなどの消化酵素によりペプチド化される。そして、ペプチド混合液は、逆相カラムによる液体クロマトグラフ (1D-HPLC) またはイオン交換カラムと逆相カラムによる液体クロマトグラフ (2D-HPLC) により分離され、分離ペプチドは質量分析装置でタンデム質量分析 (MS<sup>n</sup>) される。得られた質量分析結果は、情報処理装置に送られ、データベース検索される。検索結果より、もともと存在したタンパク質が同定される。化学反応装置の部分が、従来のバッチ処理で行うと 8 ~ 16 時間要する。2D-HPLCでは半日、1D-HPLCでは 1 時間程度必要であり、化学反応過程を含めると、従来では 2 日は必要だった。しかし、本発明の化学反応装置を用いると、半日程度で結果が得られることになり、スループットが大幅に向上する。また、生体から得られる生体サンプルはできるだけ微量であることが望ましく、そのためにはバッチ処理による損失が課題である。サンプルを希釈すると、サンプル液体の表面積が増大するため、容器やなどでの吸着による損失が無視されない。本発明の化学版の装置では、微量サンプルをできるだけ希釈せず、オンライン処理できるため、サンプルの損失を防止でき、システム全体の高感度化が実現する。この解析システムで用いられるデータベースは、入力操作により予め構築しておいたものでもよく、また外部データベースを利用し、サーバーを介して更新データにアクセスしてバージョンアップする形式のものであっても良い。

#### 【0034】

図 10 に、2D-HPLCの部分の詳細図を示す。化学反応装置の排出口 8 が 2D-HPLC のインジェクションバルブまたはトラップカラムにオンラインで接続されることが示される。一次元目の分離カラム 17 (イオン交換カラムなど) には、組成の異なる溶媒が液体リザーバー 18 よりポンプ 19、及び、ミキサー 20 によりバルブ 21 を経て導入される。一次元目の分離カラム 17 で分離されたサンプルは、六方バルブ 22 に接続されたトラップカラム 23 に一旦吸着される。次に、二次元目の分離カラム 24 (逆相カラムなど) に向けて、組成の異なる溶媒が液体リザーバー 25 よりポンプ 26、及び、ミキサー 27 によりバルブ 22 を経て導入される。二次元目の分離カラム 24 で分離されたサンプルは質量分析装置 (MS) に導入され、質量分離される。MS の出力は出力表示部で表示される。1D-H

PLCを用いる場合にも、同様に化学反応装置がオンラインで接続される。

#### 【0035】

図11に、質量分析装置を用いた糖鎖の構造解析（糖鎖シーケンス解析）プロトコル、及び、本発明の一実施例に基づく化学反応装置を組み込んだ解析システムの構成図との関係を示す。図中、点線で囲った部分が、本発明の一実施例に基づく化学反応装置を組み込んだ解析システムである。この場合には3種類の化学反応（タンパク質消化、糖鎖脱離、糖鎖消化）が必要であり、図に示すように3種類の化学反応装置が用いられる。固定化される酵素の種類、及び、反応部1の構造や反応時間、温度などが異なるだけである。従来は3種類の化学反応をバッチで処理するだけで2日程度は必要だったが、本発明の化学反応装置を用いることにより1時間程度に短縮することが可能である。

#### 【0036】

また、1D-HPLC/MS<sup>n</sup>システムにおいて、短時間で液体クロマトグラフが完了する場合には、図12に示すように複数の化学反応装置を並列で動作させることができる。このような高スループット解析では、液体クロマトグラフでの分離に要する時間との兼ね合いで、化学反応装置の数を最適化することができる。

#### 【0037】

##### 【発明の効果】

本発明の化学反応装置化学反応装置を用いることにより、化学物質を固定化した担体を収めた試料流通路において、試料の乱流や遷移流を生じさせ、試料流通路内における化学反応の効率を高めることができる。また、担体に固定化した化学物質と溶液中のサンプル分子との衝突回数を増加し、両者間の反応効率を高めることができる。このように反応効率を高めることにより、短時間で処理が完了することができるとともに、微量生体サンプルを低損失で化学反応処理することができる。

#### 【0038】

また、この化学反応装置を組み込んだ解析システムによれば、化学反応装置の高い反応効率によりスループットを大幅に向上させることができる。また、微量のサンプルをオンラインで処理できるため、サンプルの損失を防止し、システム

全体の高感度化が達成される。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の一実施例に基づく化学反応装置の構造図。

【図 2】

本発明の一実施例に基づく化学反応装置における反応部 1 の模式図。

【図 3】

本発明の一実施例に基づく化学反応装置における送液プロトコルの模式図。

【図 4】

本発明の一実施例に基づく送液プロトコルに従った化学反応装置の動作シーケンス。

【図 5】

本発明の一実施例に基づく化学反応装置の構成図。

【図 6】

本発明の一実施例に基づく化学反応装置を用いた酵素消化反応結果例。

【図 7】

本発明の一実施例に基づくタンパク質の消化反応結果例。

【図 8】

本発明の一実施例に基づく構造物を流路に配置する化学反応装置の模式図。

【図 9】

質量分析装置を用いたタンパク質の解析プロトコル、及び、本発明の一実施例に基づく化学反応装置を組み込んだ解析システム（ショットガン解析システム）の構成図。

【図 10】

2D-HPLCの部分の詳細図。

【図 11】

質量分析装置を用いた糖鎖の構造解析（糖鎖シーケンス解析）プロトコル、及び、本発明の一実施例に基づく化学反応装置を組み込んだ解析システムの構成図。

。

**【図 12】**

複数の化学反応装置を並列で動作させる解析システムの構成図。

**【符号の説明】**

1：反応部 1、2：バルブ、3：エア導入口、4：第二のポンプ、5：サンプル導入口、6：第一のポンプ、7：恒温部、8：排出口、9：バッファー導入口、10：キャピラリー、11：ガラスビーズ 11、12：別の石英キャピラリー、13：キャピラリー、14：別のキャピラリー、15：バルブ、16：排出口、17：一次元目の分離カラム、18：液体リザーバー、19：ポンプ、20：ミキサー、21：バルブ、22：六方バルブ、23：トラップカラム、24：二次元目の分離カラム、25：液体リザーバー、26：ポンプ、27：ミキサー 27。

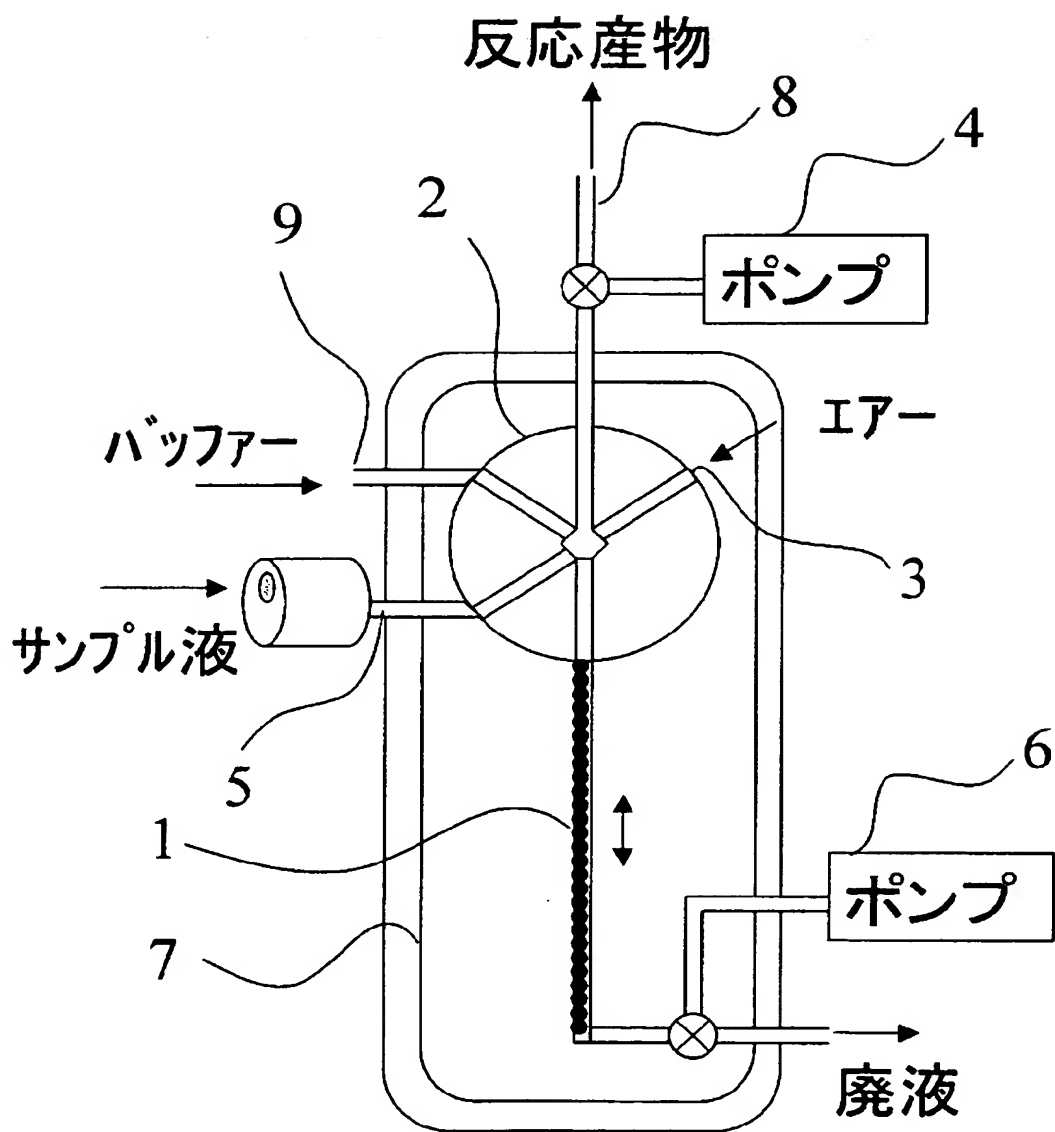


【書類名】

図面

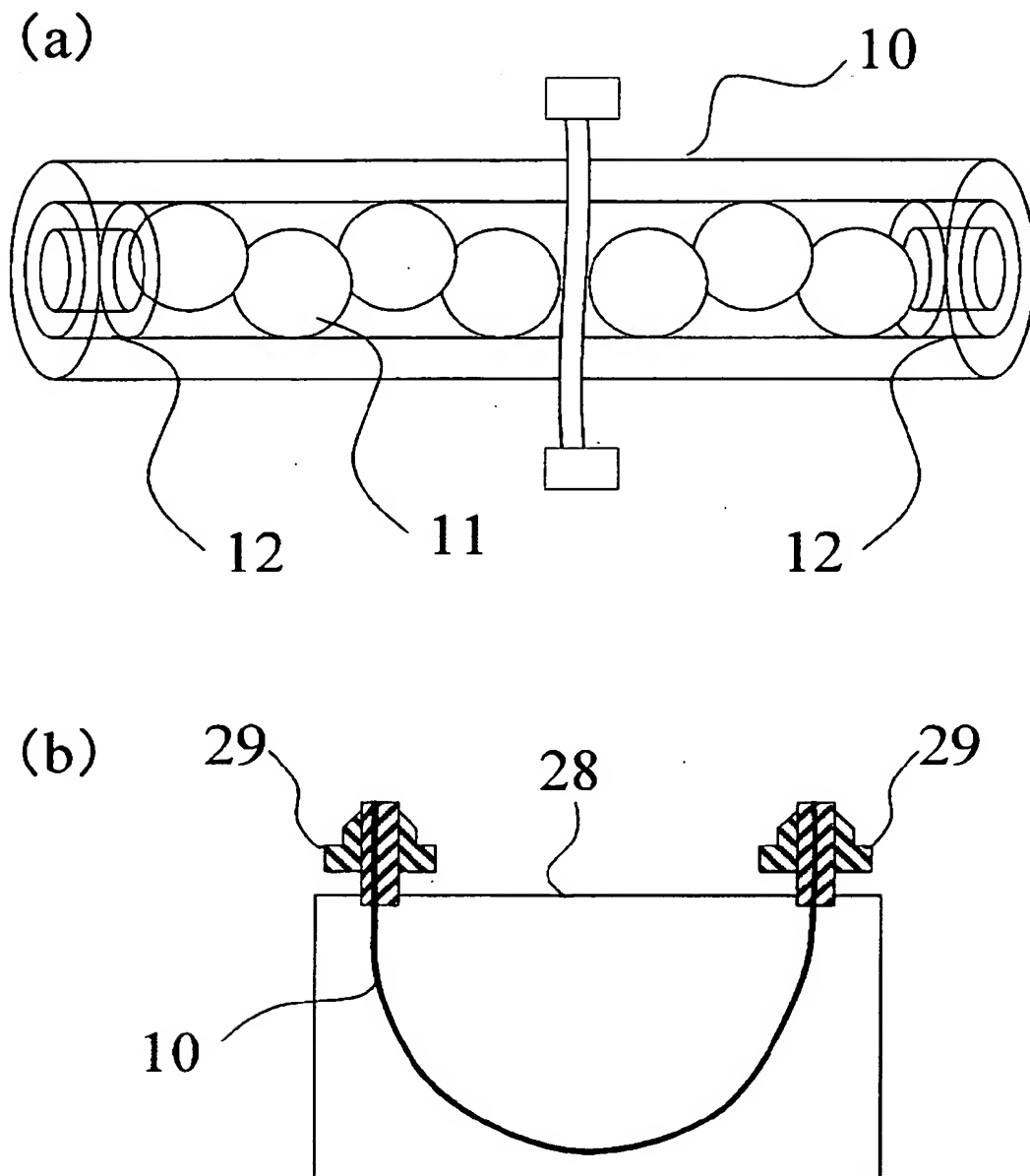
【図1】

図1



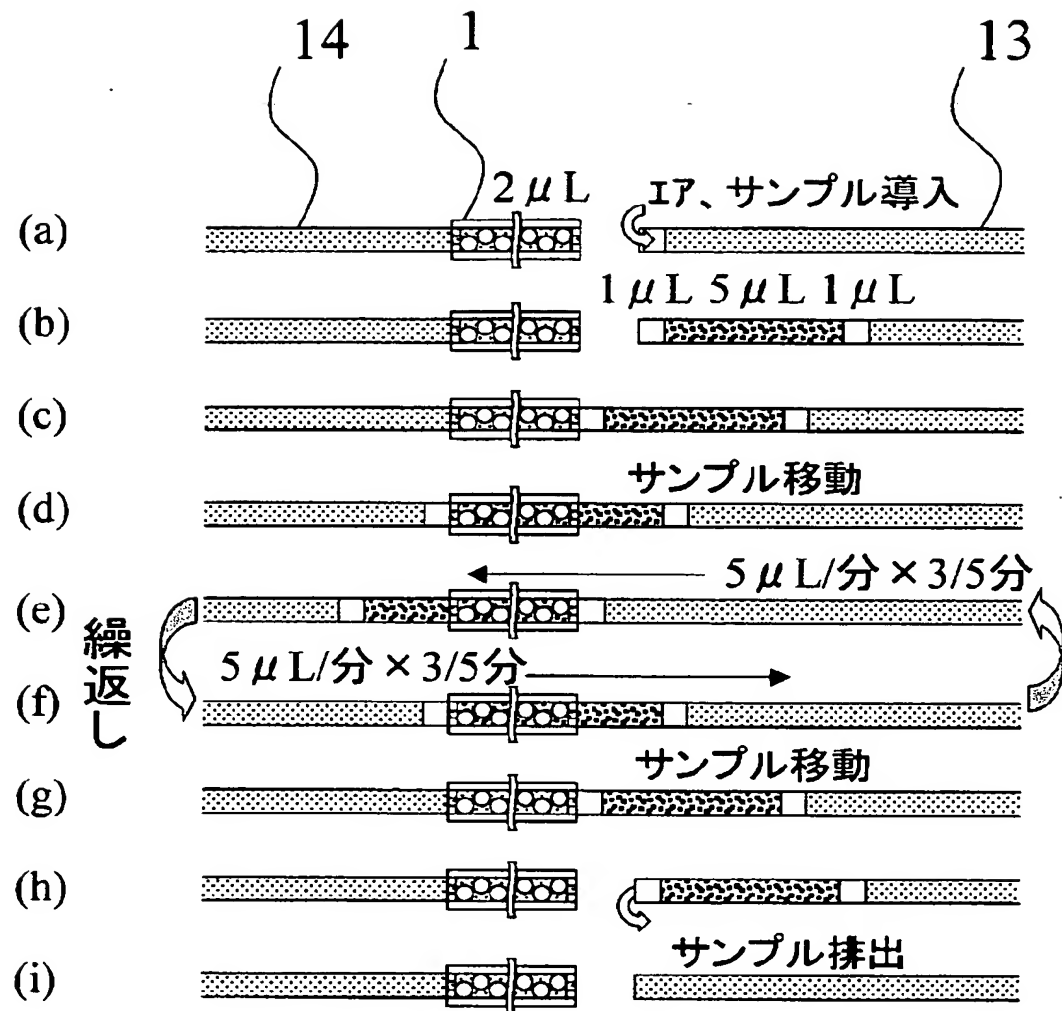
【図 2】

図 2



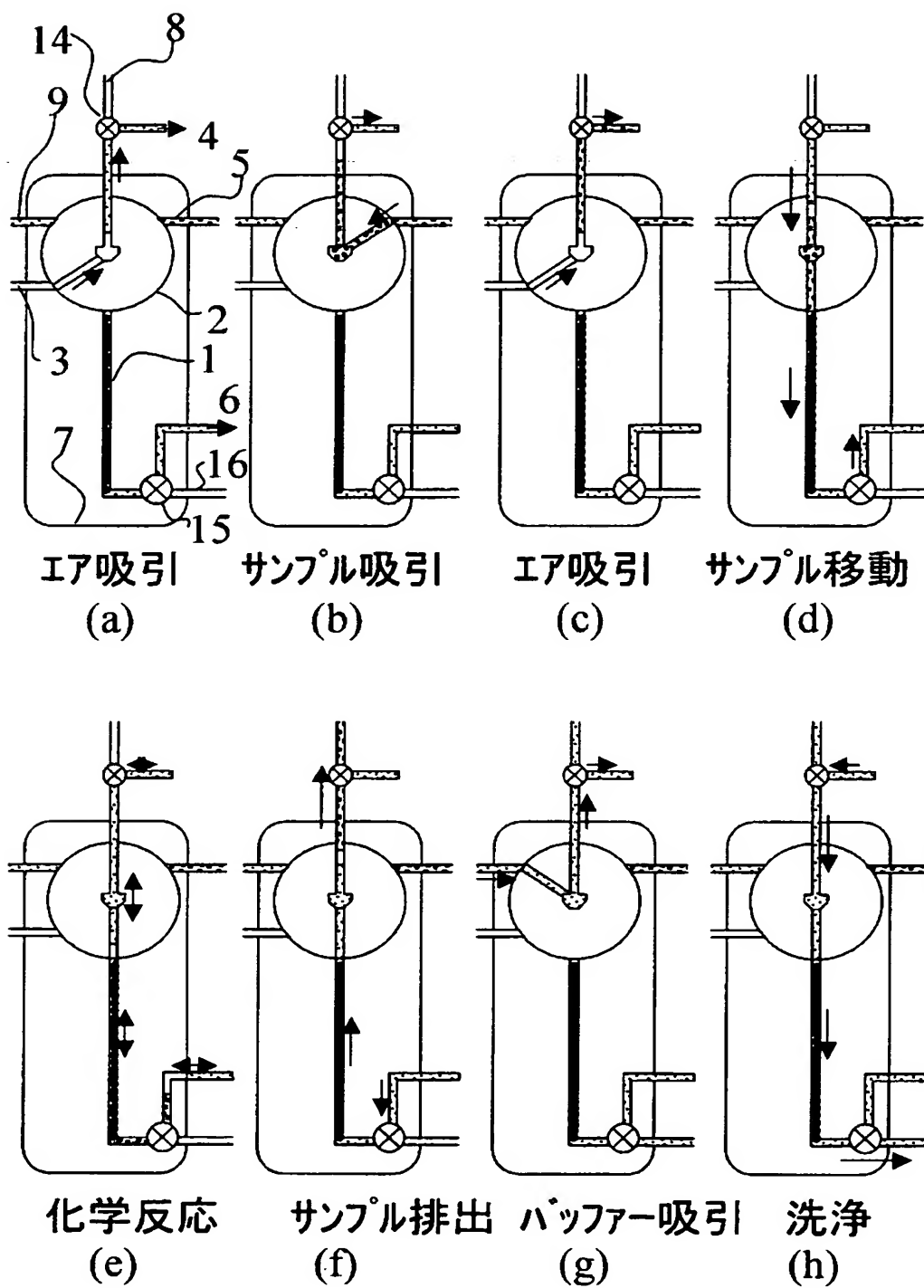
【図 3】

図3



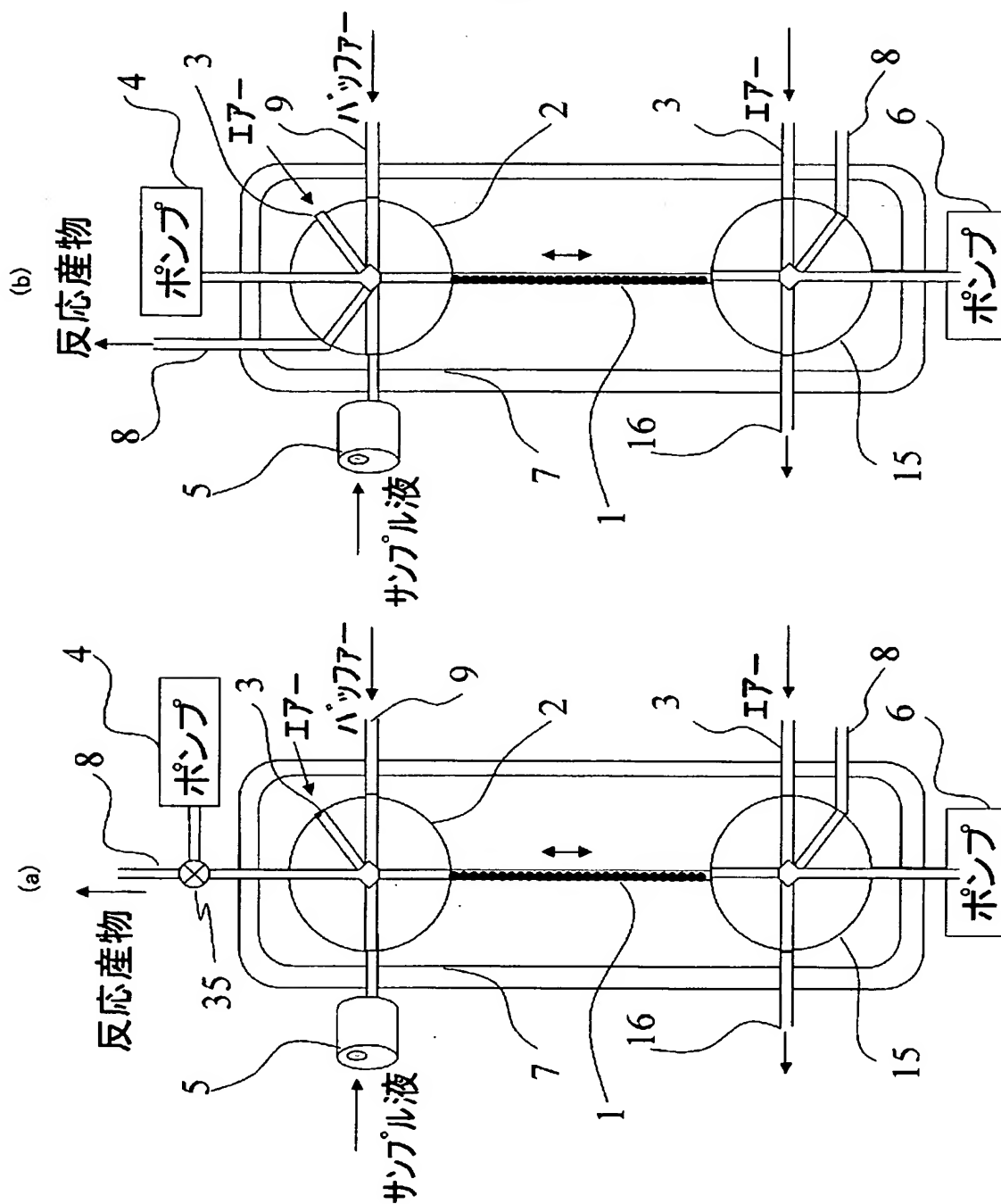
【図4】

図4



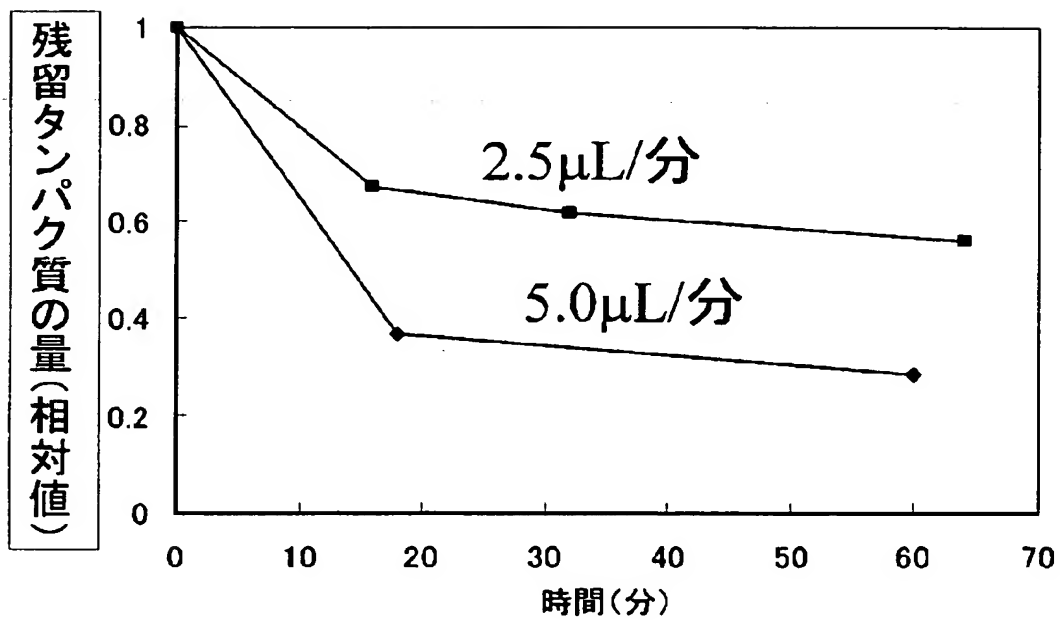
【図 5】

図5



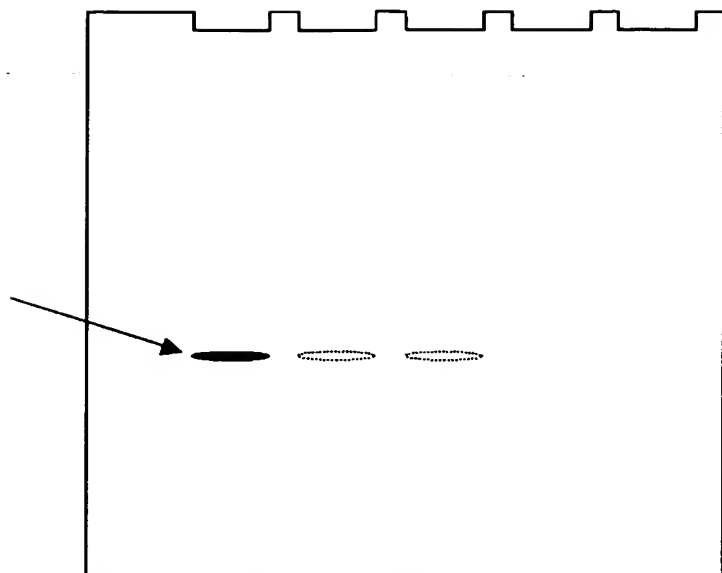
【図 6】

図6



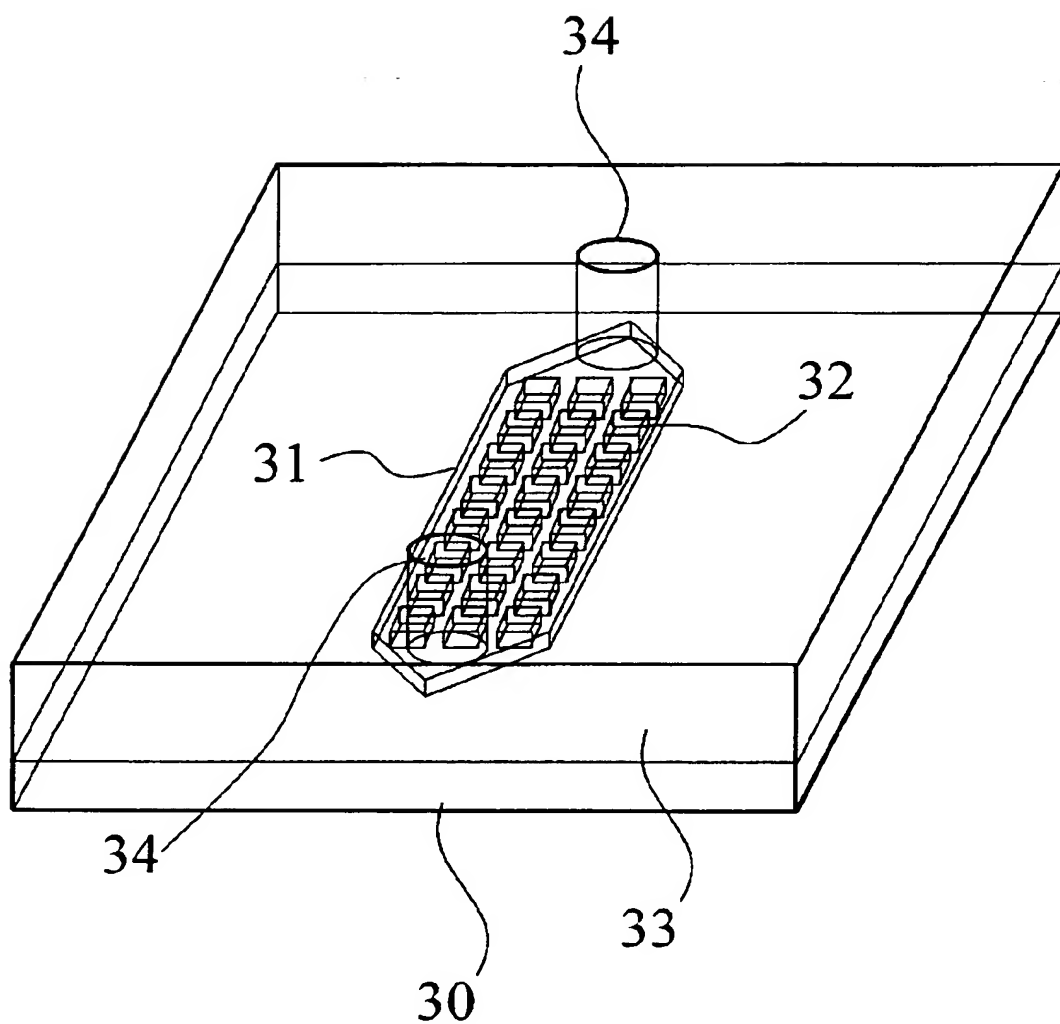
【図 7】

図 7



【図 8】

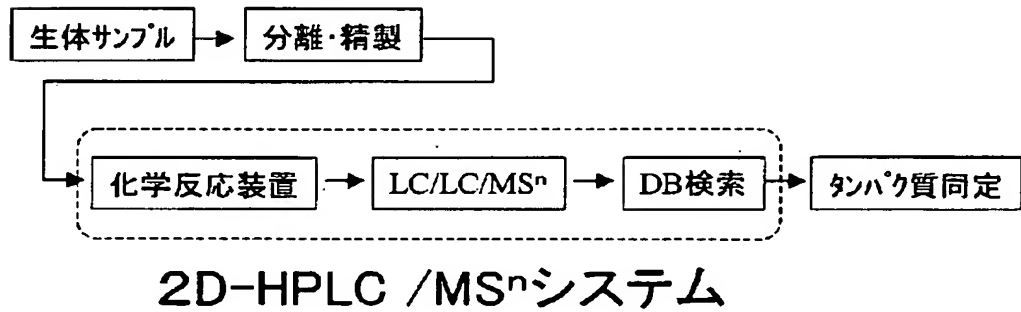
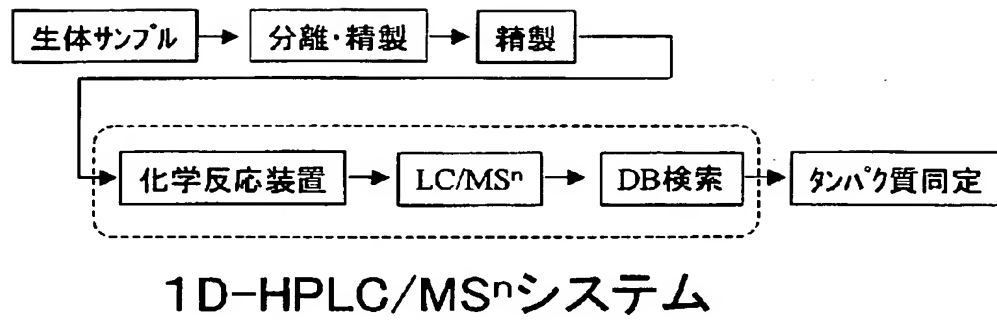
図8





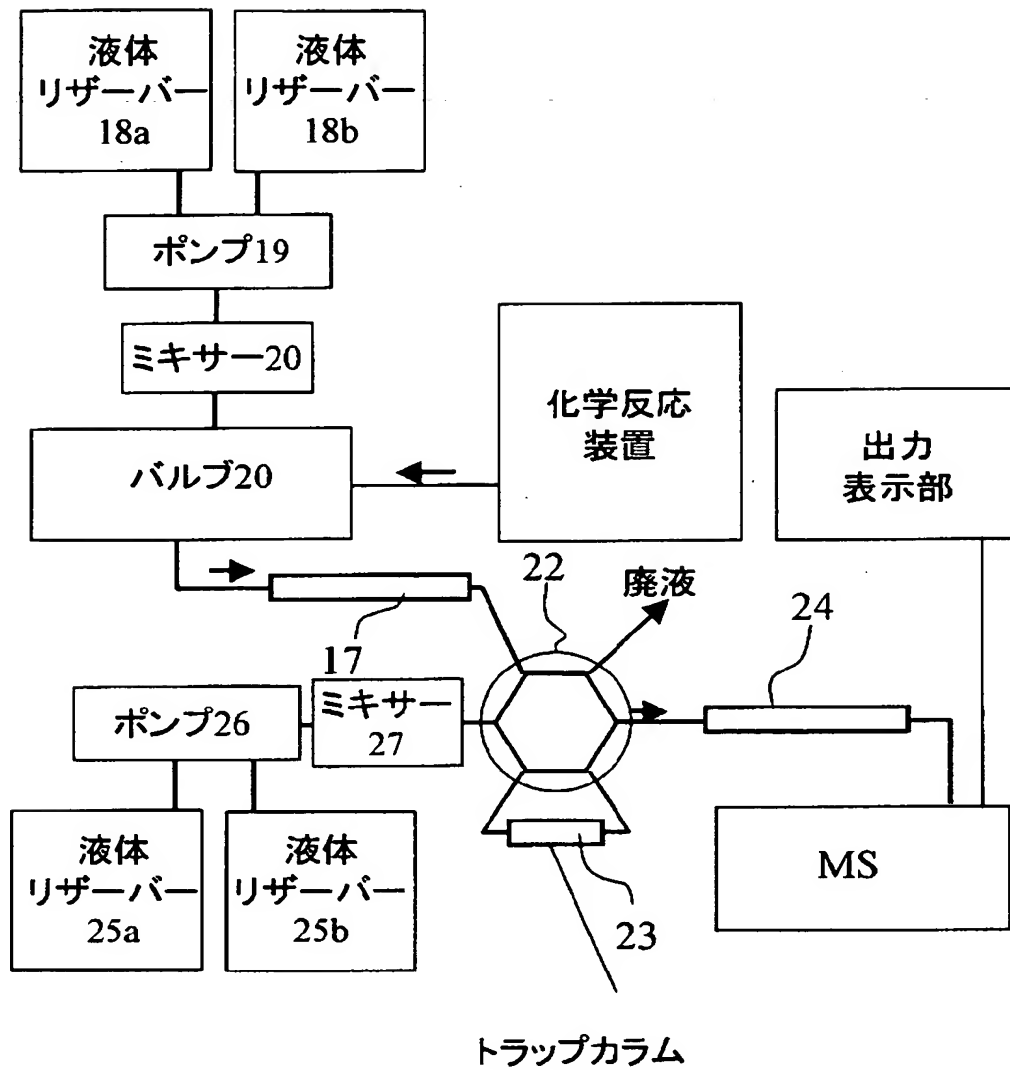
【図 9】

図9



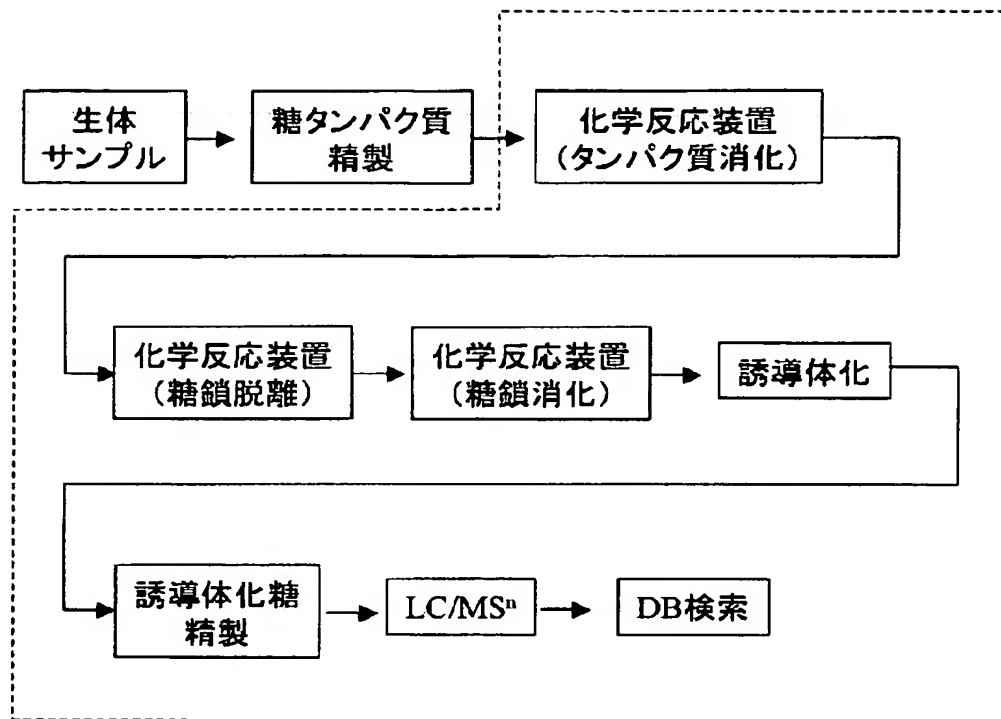
【図10】

図10



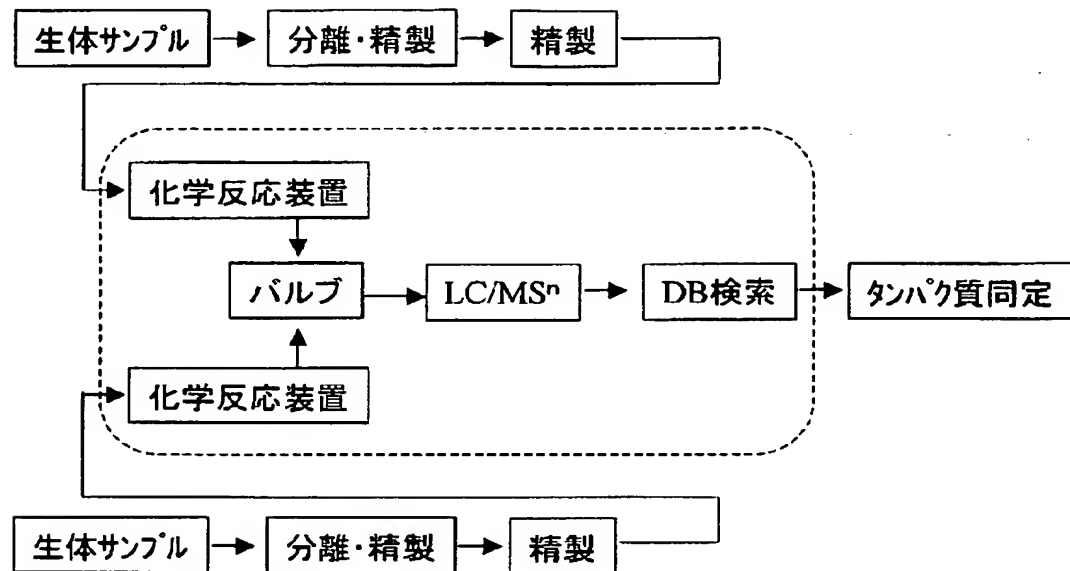
【図 11】

図 11



【図 12】

図12



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 バッチで行われる酵素反応はサンプルの損失が無視できず、またサンプル損失低減を目指した従来の技術では反応に長時間費やさざるを得なかった。

【解決手段】 管状に形成された反応部 1 は、化学物質が固定化され、バッファー液が充填される。エア導入口 3 より所定の体積のエアが吸引され、続いて、サンプル液が吸引される。さらに、所定の体積のエアが吸引される。エア、サンプル液、エアは順次反応部 1 に輸送される。反応部 1 はサンプル液で満たされ、サンプル液の両端はバッファー液との混合を防止するためのエアで挟まれる。サンプル液は、反応部 1 を所定の流速で往復運動し、高効率な化学反応を促進する。

【選択図】 図 1

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 0 7 9 3 4 6
受付番号	5 0 3 0 0 4 6 5 5 1 7
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 5 年 3 月 2 5 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】	平成15年 3月24日
-------	-------------

次頁無

特願 2003-079346

出願人履歴情報

識別番号

[000005108]

1. 変更年月日

1990年 8月31日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区神田駿河台4丁目6番地

氏 名

株式会社日立製作所